

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-350588

(P2000-350588A)

(43) 公開日 平成12年12月19日 (2000.12.19)

(51) Int. Cl.	識別記号	F I	テラード (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
1/15		1/15	
1/19		1/19	
1/21		1/21	
5/10		9/04	D
審査請求 未請求 請求項の数23 O L (全 16 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-9152(P2000-9152)

(22) 出願日 平成12年1月18日 (2000.1.18)

(31) 優先権主張番号 特願平11-101143

(32) 優先日 平成11年4月8日 (1999.4.8)

(33) 優先権主張国 日本 (JP)

(71) 出願人 596153357

早出 広司

東京都目黒区南1-13-16

(72) 発明者 早出 広司

東京都目黒区南1-13-16

(74) 代理人 100089705

弁理士 社本 一夫 (外5名)

(54) 【発明の名称】 グルコース脱水素酵素

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、改良されたグルコースに対する親和性を有する改変型水溶性PQQGDHを提供することを目的とする。

【解決手段】 ヒロロキノリンキノン補酵素とする水溶性グルコース脱水素酵素において、Acinetobacter calcoaceticus由来水溶性PQQGDHの第227残基から244残基、第186残基から221残基または第412残基から421残基に相当する領域において1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されていることを特徴とする改変型グルコース脱水素酵素。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒロロキノリンキンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus*由来水溶性PQQGDHの231番目のセリン残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項2】 ヒロロキノリンキンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus*由来水溶性PQQGDHの209番目のグルタミン残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項3】 ヒロロキノリンキンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus*由来水溶性PQQGDHの210番目のグルタミン残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項4】 ヒロロキノリンキンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus*由来水溶性PQQGDHの420番目のアスパラギン酸残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項5】 ヒロロキノリンキンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus*由来水溶性PQQGDHの421番目のアラニン残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項6】 ヒロロキノリンキンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列番号1で表されるアミノ酸配列の、第48残基から53残基、第60残基から62残基、第69残基から71残基、第79残基から82残基、第91残基から101残基、第110残基から115残基、第127残基から135残基、第147残基から150残基、第161残基から169残基、第177から179残基、第186残基から221残基、第227残基から244残基、第250残基から255残基、第261残基から263残基、第271残基から275残基、第282残基から343残基、第349残基から377残基、第382残基から393残基、第400から403残基、第412残基から421残基、第427残基から432残基、第438残基から441残基および第449残基から468残基の領域からなる群より選択される1またはそれ以上の領域において、1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、*Acinetobacter calcoaceticus*由来水溶性グルコース脱水素酵素と

比較して高い熱安定性を有することを特徴とする改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項7】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第227残基から244残基の領域において、1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている、請求項3に記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項8】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の231番目のセリン残基が、他のアミノ酸残基で置換されている、請求項7記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項9】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第186残基から221残基の領域において、1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている、請求項3に記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項10】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の209番目のグルタミン残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている、請求項9記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項11】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の210番目のグルタミン残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている、請求項9記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項12】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の第412残基から421残基の領域において、1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている、請求項3に記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項13】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の420番目のアスパラギン酸残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている、請求項12記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項14】 配列番号1で表されるアミノ酸配列の421番目のアラニン残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている、請求項12記載の改変型グルコース脱水素酵素。

【請求項15】 配列: Asn Leu Asp Gly Xaa231 Ile p  
ro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn Gly Val Val Ser  
【式中、Xaa231はSer以外の天然アミノ酸残基である】  
を含む、ヒロロキノリンキンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

【請求項16】 配列: Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln  
Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn Gln Ala GlnHis Thr  
Pro Thr Gln Xaa209 Xaa210 Leu Asn Gly Lys Asp Tyr  
His Thr Tyr Met Gly

【式中、Xaa209およびXaa210は任意の天然アミノ酸残基である、ただし、Xaa209がGlnであるとき、Xaa210はGluではない】を含む、ヒロロキノリンキンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

【請求項17】 配列: Pro Thr Tyr Ser Thr Thr Tyr  
Asp Xaa420 Xaa421

【式中、Xaa420およびXaa421は任意の天然アミノ酸残基で

ある、ただし、Xaa420がAspであるとき、Xaa421はAlaではない)を含む、ピロキニリンキンを補酵素とするグルコース脱水素酵素。

【請求項18】 請求項1-17のいずれかに記載の改変型グルコース脱水素酵素をコードする遺伝子。

【請求項19】 請求項18に記載の遺伝子を含むベクター。

【請求項20】 請求項18に記載の遺伝子を含む形質転換体。

【請求項21】 遺伝子が主染色体に組み込まれている、請求項20記載の形質転換体。

【請求項22】 請求項1-17のいずれかに記載の改変型グルコース脱水素酵素を含むグルコースアッセイキット。

【請求項23】 請求項1-17のいずれかに記載の改変型グルコース脱水素酵素を含むグルコースセンサー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はピロキニリンキノ(PQQ)を補酵素とするグルコース脱水素酵素(GDH)の特定のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型PQQGDHに関する。本発明の改変型酵素は、臨床検査や食品分析などにおけるグルコースの定量に有用である。

【0002】

【従来の技術】PQQGDHは、ピロキニリンキノを補酵素とするグルコース脱水素酵素であり、グルコースを酸化してグルコナクトンを生成する反応を触媒する。

【0003】PQQGDHには、膜結合性酵素と水溶性酵素があることが知られている。膜結合性PQQGDHは、分子量約87kDaのシングルペプチド蛋白質であり、種々のグラム陰性菌において広く見いだされている。一方、水溶性PQQGDHは*Acinetobacter calcoaceticus*のいくつもの株においてその存在が認識されており(Biosci. Biotech. Biochem. (1995), 59 (8), 1548-1555)、その構造遺伝子がクローニングされアミノ酸配列が明らかにされている(Mol. Gen. Genet. (1989), 217: 43 0-436)。A. calcoaceticus由来水溶性PQQGDHは、分子量約50kDaのホモダイマーである。他のPQQ酵素とは蛋白質一次構造上でのホモロジーがほとんどなく、その機能と構造の相関に関する研究はすすんでいないため、酵素安定性の指針とならない見解はこれまでに得られていない。

【0004】最近、オランダの研究者グループにより水溶性PQQGDHのX線結晶構造解析がおこなわれ、同酵素の高次構造が明らかとなった(J.Mol.Biol., 289, 319-333 (1999)). The crystal structure of the apo form of

the soluble quinoprotein glucose dehydrogenase from *Acinetobacter calcoaceticus* reveals a novel internal conserved sequence repeat; A.Oubrie et al., The EMBO Journal, 18(19) 5187-5194 (1999). Structure and mechanism of soluble quinoprotein glucose dehydrogenase, A. Oubrie et al., PNAS, 96(21), 11787-11791 (1999). Active-site structure of the soluble quinoprotein glucose dehydrogenase complexed with methylhydrazine: A covalent cofactor-inhibitor complex, A.Oubrie et al.). これらの論文によれば、水溶性PQQGDHは6つのW-モチーフから構成されるβプロベラ蛋白質である。

【0005】血中グルコース濃度は、糖尿病の重要なマーカーとして臨床診断上極めて重要な指標である。また、微生物を用いる発酵生産におけるグルコース濃度の定量がプロセスモニタリングにおいて重要な項目となっている。従来、グルコースはグルコースオキシゲナーゼ(GOD)あるいはグルコース6リン酸脱水素酵素(G6PDH)を用いる酵素法により定量されていた。しかし、GODを用いる方法ではグルコース酸化反応にともない発生する過酸化水素を定量するためカラーゼあるいはパーオキシゲナーゼをアッセイ系に添加する必要がある。またGODを用いるバイオセンサーの開発も進められてきたが、反応が水溶液中の溶解酸素濃度に依存することから高濃度のグルコース試料には適さないこと、あるいは溶解酸素濃度によって測定値に誤差が生じる可能性があった。一方、G6PDHは分光学的手法に基づくグルコース定量に用いられてきたが、反応系に補酵素であるNAD(P)を添加しなければならないという煩雑性があった。そこで、これまでのグルコース酵素定量方法に用いられてきた酵素にかわる新たな酵素としてPQQGDHの応用が目ざされている。PQQGDHはグルコースに対して高い酸化活性を有していること、およびPQQGDHは補酵素結合型の酵素であるため電子受容体として酸素を必要としないことから、グルコースセンサーの認識素子をはじめとして、アッセイ分野への応用が期待されている。しかしながら、PQQGDHはGODと比較して熱安定性が低いという問題点があった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】したがって、本発明は、改良された熱安定性を有する改変型水溶性PQQGDHを提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者は従来の水溶性PQQGDHを改良してその熱安定性を高め、臨床検査や食品分析などに応用できる改変型PQQGDHを開発すべく鋭意研究を行なった結果、水溶性PQQGDHの特定の領域においてアミノ酸変異を導入することにより、安定性がきわめて高い酵素を得ることに成功した。すなわち、本発明は、ピロキニリンキノを補酵素と

するグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus*由来水溶性PQQGDH (本明細書においては、野生型PQQGDHとも称される) の231番目のセリン残基に相当するアミノ酸残基、または209番目のグルタミン残基、または210番目のグルタミン酸残基、または420番目のアスパラギン酸残基、または421番目のアラニン残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素を提供する。なお、本明細書においては、アミノ酸の位置は、開始メチオニンを1として番号付けする。本発明はまた、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列番号1で表されるアミノ酸配列の、第48残基から53残基、第60残基から62残基、第69残基から71残基、第79残基から82残基、第91残基から101残基、第110残基から115残基、第127残基から135残基、第147残基から150残基、第161残基から169残基、第177から179残基、第186残基から221残基、第222残基から244残基、第250残基から255残基、第261残基から263残基、第271残基から275残基、第282残基から343残基、第349残基から377残基、第382残基から393残基、第400から403残基、第412残基から421残基、第422残基から432残基、第438残基から441残基および第449残基から468残基の領域からなる群より選択される1またはそれ以上の領域において、1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、*Acinetobacter calcoaceticus*由来水溶性PQQGDHより高い熱安定性を有することを特徴とする改変型グルコース脱水素酵素を提供する。好ましくは、本発明の改変型PQQGDHは、50℃で10分間熱処理した後の活性の残存率が天然型PQQGDHの活性の残存率より10%以上高く、より好ましくは20%以上高く、さらに好ましくは30%以上高い。また好ましくは、本発明の改変型PQQGDHは、55℃における熱失活半減期が天然型PQQGDHの熱失活半減期より5分以上長く、より好ましくは15分以上長い。本発明の特好ましい改変型PQQGDHは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第227残基から244残基、第186残基から221残基または第412残基から421残基の領域において、1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている。さらに好ましくは、本発明の改変型PQQGDHは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の231番目のセリン残基が、リジン、アスパラギン、アスパラギン酸、ヒスチジン、メチオニン、ロイシンおよびシステインからなる群より選択されるアミノ酸残基で置換されているか、または209番目のグルタミン残基がリジン残基で、または210番目のグルタミン酸残基がリジン残基で、または

420番目のアスパラギン酸残基がリジン残基で、または421番目のアラニン残基がアスパラギン酸残基で置換されている。

【0008】 また別の観点においては、本発明の改変型PQQGDHは、配列: Asn Leu Asp Gly Xaa231 Ile P ro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn Gly Val Val Ser

【式中、Xaa231はSer以外の天然アミノ酸残基である】

または配列: Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn Gln Ala GlnHis Thr Pro Thr Gln Xaa209 Xaa210 Leu Asn Gly Lys Asp Tyr His Thr Tyr Met Gly

【式中、Xaa209およびXaa210は任意の天然アミノ酸残基である。ただし、Xaa209がGlnであるとき、Xaa210はGluではない】 または配列: Pro Thr Tyr Ser Thr Thr Tyr Asp Xaa420 Xaa421

【式中、Xaa420およびXaa421は任意の天然アミノ酸残基である。ただし、Xaa420がAspであるとき、Xaa421はAlaではない】を含む。

【0009】 本発明はまた、上述の改変型グルコース脱水素酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクターおよび該遺伝子を含む形質転換体、ならびに本発明の改変型グルコース脱水素酵素を含むグルコースアッセイキットおよびグルコースセンサーを提供する。

【0010】 本発明の改変型PQQGDHの酵素蛋白質は高い熱安定性を有し、かつグルコースに対して高い酸化活性を有していることから、グルコースの高感度かつ高選択的な測定に応用できる。

【0011】

【発明の実施の形態】 改変型PQQGDHの構造

本発明者は、水溶性PQQGDHをコードする遺伝子のコーディング領域中にエラブロンPCR法によりランダムに変異を導入し、アミノ酸残基の変異が導入された水溶性PQQGDHのライブラリーを構築した。これを大腸菌に形質転換し、熱処理後のPQQGDHの残存活性についてスクリーニングして、熱安定性の向上したPQQGDHを発現する多数のクローンを得た。

【0012】 これらのクローンの一つについて遺伝子配列を解析したところ、第231番目のSerがCysに置換されていることが判明した。さらにこの残基を種々の別のアミノ酸残基に置換したところ、いずれの残基に置換しても野生型水溶性PQQGDHよりも熱安定性に優れた変異酵素が得られた。

【0013】 水溶性PQQGDHは6つのW-モチーフから構成されるβプロテイン蛋白質の構造を有している。本発明においては、ループ領域の1つである第227残基から244残基の領域中の第231番目のSerを他のアミノ酸に置換することにより、熱安定性が向上することが見いだされた。次に、他のループ領域に關して部位特異的に変異を導入し、その熱安定性の向上を試みた。第186残基から221残基のループに存在する2

09番目のGlnをLysに、同210番目のGluをLysに、第412残基から421残基のループに存在する420番目のAspをLysに、同421番目のAlaをAspに置換したところ、変異型酵素の熱安定性が向上した。

【0014】すなわち、本発明により、ループ領域中に適切な変異を導入することにより、熱安定性が向上した水溶性PQQGDHを構築することが立証された。これは、水溶性PQQGDHにおいては、W-モチーフ間のループ領域の間の相互作用がβロペラ蛋白質の構造の安定化に寄与しているためであると考えられる。上記に示したSer231、Gln209、Glu210、Asp420、Ala421残基は単なる例であり、本発明を限定するものではない。本発明は、ループ領域の構造遺伝子の特定の部位に変異を導入することによりPQQGDHの熱安定性を改良できることを当該技術分野において初めて明らかにしたものであり、PQQGDHの熱安定性を改良する方法論がここで提供される。

【0015】本発明の改変型PQQGDHは、配列番号1で表される野生型PQQGDHのアミノ酸配列中の特定の領域中にアミノ酸残基の変異を含むことを特徴とする。すなわち、本発明は、ピロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素において、配列番号1で表されるアミノ酸配列の、第48残基から53残基、第60残基から62残基、第69残基から71残基、第79残基から82残基、第91残基から101残基、第110残基から115残基、第127残基から135残基、第147残基から150残基、第161残基から169残基、第177から179残基、第186残基から221残基、第227残基から244残基、第250残基から255残基、第261残基から263残基、第271残基から275残基、第282残基から343残基、第349残基から377残基、第382残基から393残基、第400から403残基、第412残基から421残基、第427残基から432残基、第438残基から441残基および第449残基から468残基の領域からなる群より選択される1またはそれ以上の領域において、1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている構造を有する、改変型PQQGDHを提供する。

【0016】本発明の好ましい改変型PQQGDHは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の第227残基から244残基、第186残基から221残基または第412残基から421残基の領域において、1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている。さらに、本発明の特に好ましい改変型PQQGDHは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の231番目のセリン残基、リジン、アスパラギン、アスパラギン酸、ヒスチジン、メチオニン、ロイシンおよびシステインからなる群より選択されるアミノ酸残基で置換されて

いるか、またはまたは209番目のグルタミン残基がリジン残基で、または210番目のグルタミン酸残基がリジン残基で、または420番目のアスパラギン酸残基がリジン残基で、または421番目のアラニン残基がアスパラギン酸残基で置換されている。

【0017】また別の観点においては、本発明の改変型PQQGDHは、配列: Asn Leu Asp Gly Xaa231 Ile P ro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn Gly Val Val Ser

【式中、Xaa231はSer以外の天然アミノ酸残基である】

または配列: Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln Leu Ala Ty r Leu Phe Leu Pro Asn Gln Ala Gln His Thr Pro Thr G ln Xaa209 Xaa210 Leu Asn Gly Lys Asp Tyr His Thr T yr Met Gly

【式中、Xaa209およびXaa210は任意の天然アミノ酸残基である。ただし、Xaa209がGlnであるとき、Xaa210はGluではない】

または配列: Pro Thr Tyr Ser Thr Thr Tyr Asp Xaa420 Xaa421 【式中、Xaa420およびXaa421は任意の天然アミノ酸残基である。ただし、Xaa420がAspであるとき、Xaa421はAlaではない】を含む。

【0018】本発明の改変型グルコース脱水素酵素においては、グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有する限り、さらに他のアミノ酸残基の一部が欠失または置換されていてもよく、また他のアミノ酸残基が付加されていてもよい。さらに、当業者は、他の細菌に由来する水溶性PQQGDHについても、本発明の教示にしたがってループ構造を有する領域を予測し、この領域内でアミノ酸残基を置換することにより、熱安定性の向上した改変型グルコース脱水素酵素を得ることができる。特に、蛋白質の一次構造を並列して比較することにより、Acinetobacter calcoaceticus由来の水溶性PQQGDHの231番目のセリン残基、209番目のグルタミン残基、210番目のグルタミン酸残基、420番目のアスパラギン酸残基、または421番目のアラニン残基に相当するアミノ酸残基を容易に認識することができ、本発明にしたがって、かかる残基を他のアミノ酸残基で置換して改変型グルコース脱水素酵素を得ることができる。これらの改変型グルコース脱水素酵素も本発明の範囲内である。

#### 改変型PQQGDHの製造方法

Acinetobacter calcoaceticus由来の天然の水溶性PQQGDHをコードする遺伝子の配列は配列番号2で規定される。

【0019】本発明の改変型PQQGDHをコードする遺伝子は、天然の水溶性PQQGDHをコードする遺伝子において、上述のループ領域中に存在するアミノ酸残基をコードする塩基配列を、変異すべきアミノ酸残基をコードする塩基配列に置換することにより構築することができる。このような部位特異的塩基配列置換のための種々の方法が、当該技術分野において知られている。こ

のようにして得た変異遺伝子を遺伝子発現用のベクター（例えばプラスミド）に挿入し、これを適当な宿主（例えば大腸菌）に形質転換する。外來性蛋白質を発現させるための多くのベクター・宿主系が当該技術分野において知られており、宿主としては例えば、細菌、酵母、培養細胞などの種々のものを用いることができる。

【0020】ランダム変異を導入する場合には、標的とするループ領域においてエラーブローンPCR法によりランダムに変異を導入し、ループ領域に変異が導入された変異水溶性PQQGDH遺伝子ライブラリーを構築する。これを大腸菌に形質転換し、PQQGDHの熱安定性について各クローンをスクリーニングする。水溶性PQQGDHは大腸菌において発現させたときにペリプラズム空間に分泌されるため、菌体そのものを用いて容易に酵素活性の検定を行うことができる。このライブラリーを60-70℃で約30分処理した後に、グルコースおよび色素としてPMS-DCIPを加え、残存するPQQGDHの活性を目視により判定して、熱処理によって残存活性を示すクローンを選択し、遺伝子配列を解析してその変異を確認する。

【0021】上述のようにして得られた、改変型PQQGDHを発現する形質転換体を培養し、培養液から遠心分離などで菌体を回収した後、菌体をフレンチプレスなどで破砕するか、またはオスモティックショックによりペリプラズム酵素を培地中に放出させる。これを超遠心分離し、PQQGDHを含む水溶性画分を得ることができる。あるいは、適当な宿主ベクター系を用いることにより、発現したPQQGDHを培養液中に分泌させることもできる。得られた水溶性画分を、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、HPLCなどにより精製することにより、本発明の改変型PQQGDHを調製する。

#### 酵素活性の測定方法

本発明のPQQGDHは、PQQを補酵素として、グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒する作用を有する。

【0022】酵素活性の測定は、PQQGDHによるグルコースの酸化にともなう還元されるPQQの量を酸化還元色素の呈色反応により定量することができる。呈色試薬としては、例えば、PMS（フェナジメントサルフェート）-DCIP（2,6-ジクロロフェノールインドフェノール）、フェリシアン化カリウム、フェロセンなどを用いることができる。

#### 熱安定性

本発明の改変型PQQGDHの熱安定性は、酵素を高温（例えば55℃）でインキュベートし、一定時間ごとにアリコートを取り出して酵素活性を測定し、時間経過とともに酵素活性の低下をモニターすることにより評価することができる。典型的には、酵素の熱安定性は、酵素活性が50％に減少するまでに要する時間（ $t_{1/2}$ ）を

を指標として表される。

【0023】本発明の改変型PQQGDHは、野生型PQQGDHと比較して高い熱安定性を有することと特徴とする。このため、酵素生産において調製/精製時の失活が少なく収率が高い、溶液中での安定性が高く酵素の保存が容易である、本酵素を用いてアッセイキットあるいは酵素センサーを作成する過程において失活が少なく、本酵素を用いて作成されたアッセイキットあるいは酵素センサーの熱安定性が高いことから、保存性に優れるなどの利点を有する。

#### グルコースアッセイキット

本発明はまた、本発明に従う改変型PQQGDHを含むグルコースアッセイキットを特徴とする。本発明のグルコースアッセイキットは、本発明に従う改変型PQQGDHを少なくとも1回のアッセイに十分な量で含む。典型的には、キットは、本発明の改変型PQQGDHに加えて、アッセイに必要な緩衝液、メディエーター、キャリアブレーションカーブ作製のためのグルコース標準溶液、ならびに使用の指針を含む。本発明に従う改変型PQQGDHは種々の形態で、例えば、凍結乾燥された試薬として、または適切な保存溶液中の溶液として提供することができる。好ましくは本発明の改変型PQQGDHはホロ化して形態で提供されるが、アポ酵素の形態で提供し、使用時にホロ化することもできる。

#### グルコースセンサー

本発明はまた、本発明に従う改変型PQQGDHを用いるグルコースセンサーを特徴とする。電極としては、カーボン電極、金電極、白金電極などを用い、この電極上に本発明の酵素を固定化する。固定化方法としては、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどがあり、あるいはフェロセンあるいはその誘導体に代表される電子メディエーターとともにポリマー中に固定あるいは電極上に吸着固定してもよく、またこれらを組み合わせて用いてもよい。好ましくは本発明の改変型PQQGDHはホロ化した形態で電極上に固定化するが、アポ酵素の形態で固定化し、PQQを別の層としてまたは溶液中で提供することもできる。典型的には、グルタルアルデヒドを用いて本発明の改変型PQQGDHをカーボン電極上に固定化した後、アミン基を有する試薬で処理してグルタルアルデヒドをブロックする。

【0024】グルコース濃度の測定は、以下のように行うことができる。恒温セルに緩衝液を加え、PQQおよびCaCl<sub>2</sub>、およびメディエーターを加えて一定温度に維持する。メディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、フェナジメントサルフェートなどを用いることができる。作用電極として本発明の改変型PQQGDHを固定化した電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極）を用

いる。カーボン電極に一定の電圧を印加して、電流が定常になった後、グルコースを含む試料を加えて電流の増加を測定する。標準濃度のグルコース溶液により作製したキャリブレーションカーブに従い、試料中のグルコース濃度を計算することができる。

【0025】

【実施例】以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### 実施例1

変異PQQGDH遺伝子ライブラリの構築およびスクリーニング

Taq DNAポリメラーゼ (5U/μl)	0.5 μl
テンプレートDNA	1.0 μl
フォワードプライマー-ABF	4.0 μl
リバープライマー-ABR	4.0 μl
10× Taqポリメラーゼバッファー	10.0 μl
1M β-メルカプトエタノール	1.0 μl
DMSO	10.0 μl
5mM MnCl <sub>2</sub>	10.0 μl
10mM dGTP	2.0 μl
2mM dATP	2.0 μl
10mM dCTP	2.0 μl
10mM dTTP	2.0 μl
H <sub>2</sub> O	51.5 μl

プラスミドpGB2は、ベクターpTrc99A (ファルマシア社製)のマルチクローニング部位に、*Acinetobacter calcoaceticus*由来PQQGDHをコードする構造遺伝子を挿入したものである(図1)。このプラスミドをテンプレートとして、エラーブローンPCR法によりコーディング領域中にランダムに変異を導入した。PCR反応は、表1に示す組成の溶液中で、94℃3分間、次に、94℃3分間、50℃2分間、および72℃2分間を30サイクル、最後に72℃で10分間の条件で行った。

【0026】

【表1】

100.0 μl
----------

得られた変異水溶性PQQGDHのライブラリーを大腸菌に形質転換し、形成された各コロニーをマイクロタイタープレートに移した。プレートで60℃で約30分熱処理した後に、グルコースおよびPMS-DCIPを加え、残存するPQQGDHの活性を目視で判定した。熱処理後においてもPQQGDHの活性を示すクローンが多数得られた。

【0027】このうち1つのクローンを任意に選び、遺伝子配列を解析したところ、第231番目のセリンがシステインに変異していたことがわかった。

#### 実施例2

改変型酵素PQQGDH遺伝子の構築

配列番号2に示される*Acinetobacter calcoaceticus*由

来PQQGDHの構造遺伝子をもとに、常法に従って部位特異的変異により231番目のセリン残基、209番目のグルタミン残基、210番目のグルタミン酸残基、420番目のアスパラギン酸残基、または421番目のアラニン残基をコードする塩基配列を所定のアミノ酸残基をコードする塩基配列に置換した。部位特異的変異はプラスミドpGB2を用いて、図2に示す方法により行った。変異に用いた合成オリゴヌクレオチドターゲットプライマーの配列を表2に示す。表2においては、例えば「S231D」は、231番目のセリンがアスパラギン酸に置換されていることを表す。

【0028】

【表2】

S231D	5'-C CTT TGG AAT ATC TCC ATC AAG ATT TAA GC-3'
S231H	5'-C CTT TGG AAT ATG TCC ATC AAG ATT TAA GC-3'
S231K	5'-C CTT TGG AAT TTT TCC ATC AAG ATT TAA GC-3'
S231L	5'-C CTT TGG AAT CAT TCC ATC AAG ATT TAA GC-3'
S231M	5'-C CTT TGG AAT AGT TCC ATC AAG ATT TAA GC-3'
S231N	5'-C CTT TGG AAT ATT TCC ATC AAG ATT TAA GC-3'
I278F	5'-C AAT GAG GTT GAA TTC ATC GTC AGA G-3'
Q209K	5'-G ACC ATT CAG TTC TTT TTG AGT TGG C-3'
E210X	5'-G ACC ATT CAG TTT TTG TTG AGT TGG C-3'
D420K	5'-A CAT CGG TAC AGC TTT ATC ATA AGT AG-3'
A421D	5'-A CAT CGG TAC ATC GTC ATC ATA AGT AG-3'



ベクタープラスミド pKF18k (宝酒造 (株)) に *Acinetobacter calcoaceticus* 由来 PQQGDH をコードする遺伝子の一部を含む *Kpn* I-Hind III 断片を組み込み、これをテンプレートとした。このテンプレート 50 fmol と宝酒造 (株) 製 Mutan (登録商標) -Express Km キットに付属のセレクションプライマー 5 pmol、リン酸化したターゲットプライマー 50 pmol を全体 (20  $\mu$ l) の 1/10 量の同キットのアニーリングバッファーとともに混合し、100℃、3分間の熱処理でプラスミドを変性させ、1本鎖にした。セレクションプライマーは pKF18k のカナマイシン耐性遺伝子上にある二重のアンパー変異を復帰させるためのものである。これを5分間氷上に置き、プライマーをアニーリングさせた。これに 3  $\mu$ l の同キットエクステンションバッファー、1  $\mu$ l の T4 DNA リガーゼ、1  $\mu$ l の T4 DNA ポリメラーゼおよび 5  $\mu$ l の滅菌水を加えて相補鎖を合成した。

[0029] これを DNA のミスマッチ修復能欠損株である *E. coli* BMH7 1-18 mutS に形質転換し、一晚振とう培養を行ってプラスミドを増幅させた。次に、ここから抽出したプラスミドを *E. coli* MV1184 に形質転換し、そのコロニーからプラスミドを抽出した。そしてこれらのプラスミドについてシーケンズを行い、目的とした変異の確認を行った。この断片を、プラスミド pGB2 上の野生型 PQQGDH をコードする遺伝子の *Kpn* I-Hind III 断片と入れ替え、改変型 PQQGDH の遺伝子を構築した。

#### 実施例 3

##### 改変型酵素の調製

野生型または改変型 PQQGDH をコードする遺伝子を、*E. coli* 用の発現ベクターである pTrc99A (ファルマシア社) のマルチクローニングサイトに挿入し、構築されたプラスミドを *E. coli* DH5  $\alpha$  株に形質転換した。これを 450 ml の L 培地 (アンピシリン 50  $\mu$ g/ml、クロラムフェニコール 30  $\mu$ g/ml 含有) で坂口フラスコを用いて 37℃ で一晚振とう培養し、1 mM CaCl<sub>2</sub>、500  $\mu$ M PQQ を含む 7 l の L 培地に接種した。培養開始後約 3 時間でイソプロピルチオガラクトシドを最終濃度 0.3 mM になるように添加し、その後 1.5 時間培養した。培養液から遠心分離 (5000  $\times$ g、10分、4℃) で菌体を回収し、この菌体を 0.85% NaCl 溶液で 2 回洗浄した。集菌した菌

体をフレンチプレスで破砕し、遠心分離 (10000  $\times$ g、15分、4℃) で未破砕の菌体を除去した。上清を超速心分離 (160500  $\times$ g (40000r.p.m.)、90分、4℃) し、水溶性画分を得た。これを粗精製酵素標品として以下の実施例において用いた。

[0030] さらに、こうして得た水溶性画分を 10 mM リン酸緩衝液 pH7.0 で一晚透析した。透析したサンプルを 10 mM リン酸緩衝液 pH7.0 で平衡化した陽イオン交換クロマトグラフィー用充填カラム TSK gel CM-TYOPEARL 650M (東ソー株式会社) に吸着させた。このカラムを 10 mM リン酸緩衝液 pH7.0、750 ml で洗浄した後、0.02 M NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液 pH7.0 を用い、酵素を溶出させた。流速は 5 ml/min で行った。GDH 活性を有する画分を回収し、10 mM MOPS-NaOH 緩衝液 (pH7.0) で一晚透析した。このようにして電気泳動的に均一な改変型 PQQGDH 蛋白質を得た。これを精製酵素標品として以下の実施例において用いた。

#### 実施例 4

##### 酵素活性の測定

酵素活性の測定は 10 mM MOPS-NaOH 緩衝液 (pH7.0) 中において PMS (フェナジンメトサルフェート)-DCIP (2,6-ジクロロフェノールインドフェノール) を用い、DCIP の 600 nm の吸光度変化を分光光度計を用いて追跡し、その吸光度の減少速度を酵素の反応速度とした。このとき、1 分間に 1  $\mu$ mol の DCIP が還元される酵素活性を 1 ユニットとした。また、DCIP の pH7.0 におけるモル吸光係数は 16.8 mM<sup>-1</sup> とした。

#### 実施例 5

##### 粗精製酵素標品の熱安定性の評価

実施例 3 で得られた野生型および各改変型 PQQGDH の粗精製酵素標品をそれぞれ 1  $\mu$ M PQQ、1 mM CaCl<sub>2</sub> 存在下で 1 時間以上ホロ化した後、55℃ でインキュベートした。一定時間ごとにアリコートを取り出し、氷上で急冷した。これらのサンプルの酵素活性を実施例 4 の方法に従って測定し、活性が 50% に低下するのに要する時間 (t<sub>1/2</sub>) として表した。

[0031] 結果を表 3 に示す。

[0032]

[表 3]

	t <sub>1/2</sub> (分)
野生型	10
S231K	95
S231L	16
S231D	25
S231C	50
S231M	14
S231H	15

S 2 3 1 N	5 0
I 2 7 8 F	2 5
Q 2 0 9 K	4 0
E 2 1 0 K	4 0
D 4 2 0 K	2 0
A 4 2 1 D	8 0

本発明の改変型PQQGDHの55℃における熱失活の半減期はいずれも野生型PQQGDHの55℃における熱失活の半減期より長く、野生型PQQGDHと比較して高い熱安定性を有することがわかる。

#### 実施例6

##### 精製酵素標品の熱安定性の評価

実施例3で得られた野生型酵素およびS231K改変型酵素の精製酵素標品を用いて、実施例5と同様に55℃における熱失活の半減期を測定した。野生型の精製酵素の熱失活の半減期は5分であり、S231K改変型酵素の熱失活の半減期は41分であった。

【0033】次に、実施例3で得られた野生型酵素およびS231K改変型酵素の精製酵素標品をそれぞれ1μMPQQ、1mM CaCl<sub>2</sub>存在下で1時間以上ホロ化した。次に、1μMPQQ、1mM CaCl<sub>2</sub>、10mM MOPS緩衝液(pH7.0)中で、指示された温度で10分間インキュベートした後、氷上で急冷した。これらの試料の酵素活性を実施例4の方法に従って測定し、熱処理前の活性に対する残存活性として表した。

【0034】結果を図3に示す。S231K改変型酵素は、40℃から62.5℃までの各温度において、野生型酵素と比較して高い活性を有していた。

#### 実施例7

##### 酵素活性の評価

実施例3で得られたS231K改変型酵素の粗精製酵素標品をそれぞれ1μMPQQ、1mM CaCl<sub>2</sub>存在下で1時間以上ホロ化した。これを187μlずつ分注し、3μlの活性試薬(6mMDCIP48μl、600mMPS8μl、10mMリン酸緩衝液pH7.016μl)および各濃度のD-グルコース溶液10μlを加え、実施例4に示す方法により室温で酵素活性を測定した。基質濃度対酵素活性のプロットから、KmおよびVmaxを求めた。S231Kのグルコースに対するKm値は約20mMであり、Vmax値は3300U/mgであった。これまで報告されている野生型PQQGDHのグルコースに対するKm値は約20mMであり、Vmax値は測定条件により2500-7000U/mgである。この結果から、S231K改変型PQQGDHは、野生型PQQGDHに匹敵する高い活性を有する酵素であることがわかる。

#### 実施例8

##### 基質特異性の評価

各改変型酵素の粗精製酵素標品について基質特異性を調

べた。基質として、それぞれ20mMのグルコース、および2-デオキシ-D-グルコース、マンノース、アロース、3-オメチル-D-グルコース、ガラクトース、キシロース、ラクトースおよびマルトースを用い、1μMPQQおよび1mM CaCl<sub>2</sub>の存在下で30分間インキュベートして、実施例7と同様に酵素活性を測定した。値はグルコースを基質としたときの活性に対する相対活性で表した。図4に示されるように、本発明の改変型酵素はいずれも野生型酵素と同様の基質特異性を示した。

#### 実施例9

##### グルコースのアクセシ

改変型PQQGDHを用いてグルコースをアクセシした。S231K改変型酵素を、1μMPQQ、1mM CaCl<sub>2</sub>存在下で1時間以上ホロ化し、各種濃度のグルコースおよび5μMPQQ、10mM CaCl<sub>2</sub>存在下で酵素活性を測定した。方法は実施例4に記載の酵素活性の測定法に準じ、DCIPの600nmの吸光度の変化を指標とした。図5に示されるように、S231K改変型PQQGDHを用いて、5mM-50mMの範囲でグルコースの定量を行うことができる。

#### 実施例10

##### 酵素センサーの作製および評価

5UのS231K改変型酵素にカーボンペースト20mgを加えて凍結乾燥させた。これをよく混合した後、既にカーボンペーストが約40mg充填されたカーボンペースト電極の表面だけに充填し、濾紙上で研磨した。この電極を1%のグルタルアルデヒドを含む10mM MOPS緩衝液(pH7.0)中で室温で30分間処理した後、20mMリジンを含む10mM MOPS緩衝液(pH7.0)中で室温で20分間処理してグルタルアルデヒドをブロッキングした。この電極を10mM MOPS緩衝液(pH7.0)中で室温で1時間以上平衡化した。電極は4℃で保存した。

【0035】作製した酵素センサーを用いてグルコース濃度の測定を行った。得られたキャリブレーションカーブを図6に示す。すなわち、本発明の改変型PQQGDHを固定化した酵素センサーを用いて、1mM-12mMの範囲でグルコースの定量を行うことができた。

#### 【0036】

【発明の効果】改変型PQQGDHは熱安定性に優れていることから、酵素生産において調製/精製時の失活が少なく収率が高い、溶液中での安定性が高く酵素の保存が容易である、本酵素を用いてアクセシキットあるいは

酵素センサーを作成する過程において失活が少なく、本酵素を用いて作成されたアッセイキットあるいは酵素センサーの熱安定性が高いことから、保存性に優れるとい

った利点が期待される。

[0037]

[配列表]

# Sequence Listing

<110> Sode, Koji

<120> Glucose Dehydrogenase

<130> 000029

<150> JP 11-101143

<151> 1999-4-8

<160> 16

<210> 1

<211> 454

<212> PRT

<213> Acinetobacter calcoaceticus

<400> 1

```

Asp Val Pro Leu Thr Pro Ser Gln Phe Ala Lys Ala Lys Ser Glu Asn
 1             5             10             15
Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu
          20             25             30
Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln Ile Trp Leu Thr Glu Arg Ala Thr Gly
          35             40             45
Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro Glu Ser Gly Ser Val Lys Thr Val Phe
          50             55             60
Gln Val Pro Glu Ile Val Asn Asp Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu
          65             70             75             80
Gly Phe Ala Phe His Pro Asp Phe Lys Asn Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile
          85             90             95
Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn
          100            105            110
Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr Thr Tyr Asn Lys Ser Thr Asp Thr Leu
          115            120            125
Glu Lys Pro Val Asp Leu Leu Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His
          130            135            140
Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr
          145            150            155            160
Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn
          165            170            175
Gln Ala Gln His Thr Pro Thr Gln Gln Glu Leu Asn Gly Lys Asp Tyr
          180            185            190
His Thr Tyr Met Gly Lys Val Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Ile
          195            200            205
Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr
          210            215            220
Leu Gly His Arg Asn Pro Gln Gly Leu Ala Phe Thr Pro Asn Gly Lys
          225            230            235            240
Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu
          245            250            255
Ile Val Lys Gly Gly Asn Tyr Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys
          260            265            270
Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Ala Asn Lys

```

275                      280                      285  
 Ser Ile Lys Asp Leu Ala Gln Asn Gly Val Lys Val Ala Ala Gly Val  
 290                      295                      300  
 Pro Val Thr Lys Glu Ser Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro  
 305                      310                      315                      320  
 Leu Lys Thr Leu Tyr Tyr Thr Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro  
 325                      330                      335  
 Thr Cys Gly Glu Met Thr Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser  
 340                      345                      350  
 Ser Ala Tyr Val Tyr Lys Gly Gly Lys Lys Ala Ile Thr Gly Trp Glu  
 355                      360                      365  
 Asn Thr Leu Leu Val Pro Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg Ile  
 370                      375                      380  
 Lys Leu Asp Pro Thr Tyr Ser Thr Thr Tyr Asp Asp Ala Val Pro Met  
 385                      390                      395                      400  
 Phe Lys Ser Asn Asn Arg Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Asp Gly  
 405                      410                      415  
 Asn Val Leu Tyr Val Leu Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys Asp  
 420                      425                      430  
 Asp Gly Ser Val Thr Asn Thr Leu Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile Lys  
 435                      440                      445  
 Phe Thr Tyr Lys Ala Lys  
 450

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1612

&lt;212&gt; DNA

<213> *Acinetobacter calcoaceticus*

&lt;400&gt; 2

agctacttll atgcacaga gccctcaga aatttagatt ttaatagatt cgtttatcat 60  
 cataatcaaa atcalataga gaactcgtac aaaccttita ttagaggttt aaaaattctc 120  
 ggaanaattll gacaatttll aaggctgaca catgaataaa catttatlga claaaattgc 180  
 ttattatagc gcgtttcagc tagttacact ctacgaattl gcgtatgic ctctaatccc 240  
 atctcaattl gctaaagcca aatcagagaa ctltgacaag aaagtatttc tatctaatcl 300  
 aaslaagccg catgcttltgt tatggggacc agataatcaa attlgtllaa ctgagcgcag 360  
 aacaggtsaag attctaaagc ttaattcaga gtccggttagt glaanaacag ttttccaggt 420  
 accagagatt gtcaatgag ctgatggcca gaalggttta ttagggtttg ccttccatcc 480  
 tgaattttaa aataatctcl atatctatat ttacagttaca tttaaaaatc cgaatctac 540  
 agataaagaa ttaccgaacc aaacgattal tctgtcttat acctataala aatcaacaga 600  
 taactctgag aagccagtcg atttatagc agattacct tcatcaaaag accatcagtc 660  
 aggtctctll gicatlgggc cagatcaaaa gatttatatt acgatlggig accaaggggc 720  
 taaccagctll gcttatttgt ttcttgcaaa tcaagcaca caatcgccaa ctcaacaaga 780  
 actgaatgtt aaagactatc acacctatal gggaagaatg ctacgtttaa atctgatgg 840  
 aagtattcca aaggataatc caagttttaa cggggctgtt agccataatt atacactlgt 900  
 acatcgtlaa cgcaggggtc tagcatttcc tccaaatgtt aaattatgic agtctgaaca 960  
 agggcccaac ctgacgaig aaattaacct catlgtcaaa ggltggcaatt atggttgccc 1020  
 gaatttagca ggttataaag atgatagtg ctatgcttat gcaattatll cagcagcagc 1080  
 caataagta attaaagatt tagctcaaaa tggagtaaaa gtacggccag ggttccctgt 1140  
 gacgaagaa ttgaatlgga ctgttaaaaa ctltgtccca ccaataaaaa ctttatatc 1200  
 cgttcaagat acctacaact ataactatcc aactlgtgga gagaagacct acatttctgt 1260  
 gccaacagtt gcacctgtcat ctgcctatgt ctataaggcc ggtaaaaaag caatttctgt 1320

ttggaaaaat acattatgg ttccatcttt aaaacgigg gtcattttcc gtatlaagtt 1380  
 agatccaact tatagacta ctatgaiga cgcgtaccg atgtttaaga gcaacaaccg 1440  
 ttaicgtgat gtaglgaac gtccagatgg gaatgtctta tatgtattaa ctgatactgc 1500  
 cggaaagtc caaaaagag atggctcagt aacaaataca ttgaaaaacc caggatctct 1560  
 catlaagttc acctaaagg cttaagtaata cagtcgcatt aaaaaaccga tc 1612

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> Acinetobacter calcoaceticus

<220>

<222> 4

<223> Xaa is any amino acid residue

<400> 3

Asn Leu Asp Gly Xaa Ile Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn Gly Val

1 5 10 15

Val Ser

<210> 4

<211> 36

<212> PRT

<213> Acinetobacter calcoaceticus

<220>

<222> 24

<223> Xaa is any amino acid residue

<222> 25

<223> Xaa is any amino acid residue

<400> 4

Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn Gln

1 5 10 15

Ala Gln His Thr Pro Thr Gln Xaa Xaa Leu Asn Gly Lys Asp Tyr His

20 25 30

Thr Tyr Met Gly

35

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Acinetobacter calcoaceticus

<220>

<222> 9

<223> Xaa is any amino acid residue

<222> 10

<223> Xaa is any amino acid residue

<400> 5

Pro Thr Tyr Ser Thr Thr Tyr Asp Xaa Xaa

1 5 10

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 6  
cccttgggaat atctccatca agatttaagc 30  
<210> 7  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> primer for point mutation  
<400> 7  
cccttgggaat atgtccatca agatttaagc 30  
<210> 8  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> primer for point mutation  
<400> 8  
cccttgggaat ttctccatca agatttaagc 30  
<210> 9  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> primer for point mutation  
<400> 9  
cccttgggaat catccatca agatttaagc 30  
<210> 10  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> primer for point mutation  
<400> 10  
cccttgggaat agtccatca agatttaagc 30  
<210> 11  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> primer for point mutation  
<400> 11  
cccttgggaat atttccatca agatttaagc 30  
<210> 12  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> primer for point mutation  
<400> 12

```

caatgagggt gaattacatg tcagag 26
<210> 13
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer for point mutation
<400> 13
gaccattcag ttcttttga gttggc 26
<210> 14
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer for point mutation
<400> 14
gaccattcag ttttttga gttggc 26
<210> 15
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer for point mutation
<400> 15
acatcggtac agctttatca taagtag 27
<210> 16
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer for point mutation
<400> 16
acatcggtac atcgatca taagtag 27

```

【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、本発明において用いたプラスミドpGB2の構造を示す。

【図2】 図2は、本発明の改変型酵素をコードする突然変異遺伝子を作成する方法を示す。

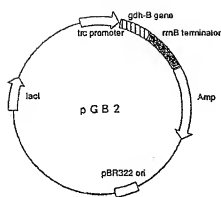
【図3】 図3は、本発明の改変型酵素の熱安定性を示す。

【図4】 図4は、本発明の改変型酵素の基質特異性を示す。

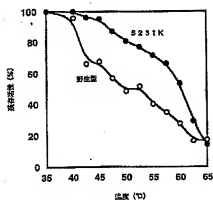
【図5】 図5は、本発明の改変型PQQGDHを用いるグルコースのアッセイを示す。

【図6】 図6は、本発明の改変型PQQGDHを用いる酵素センサーのキャリブレーションカーブを示す。

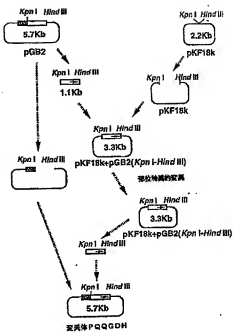
【図1】



【図3】



【図2】

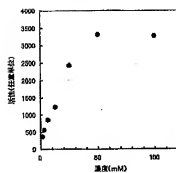


【図4】

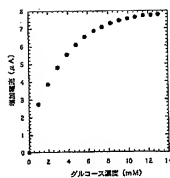
糖質型	S231K	S231C	S231L	S231D	S231N	S231M	S231H
グルコース	100	100	100	100	100	100	100
2-デオキシ-D-グルコース	4	5	3	2	6	5	2
マンノース	13	10	8	9	13	12	9
アロース	47	43	46	38	62	61	43
3-オ-メチル-D-グルコース	81	82	76	71	105	109	80
ガラクトース	11	15	14	12	20	18	10
キシロース	7	5	8	6	12	15	8
ラクトース	61	59	69	54	73	66	56
マルトース	61	70	69	38	76	51	41



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

C 1 2 N 9/04

C 1 2 Q 1/54

識別記号

F I

C 1 2 Q 1/54

C 1 2 N 5/00

特許コード (参考)

A

L1 ANSWER 1 OF 1 WPINDEX COPYRIGHT 2003 THOMSON DERWENT on STN  
AN 2000-063928 [06] WPINDEX  
DNN N2000-050098

TI Cross link for cardan joint fitting.

DC Q63

IN REYNOLDS, J T

PA (DANC) DANA CORP

CYC 3

PI DE 19925895 A1 19991223 (200006)\* 8p F16D003-26  
JP 2000009152 A 20000111 (200013) 6p F16D003-41 <--  
US 6077166 A 20000620 (200035) F16D003-16

ADT DE 19925895 A1 DE 1999-19925895 19990607; JP 2000009152 A JP 1999-150495  
19990528; US 6077166 A US 1998-93456 19980608

PRAI US 1998-93456 19980608

IC ICM F16D003-16; F16D003-26; F16D003-41

ICS F16D003-84

/ BINARY DATA / 0308223001.TIF

AB DE 19925895 A UPAB: 20000203

NOVELTY - The cross link has a journal (12) with a projection (12b) extending out radially, and a dust shield (30) with a sector running radially inward, a surface of which forms an internal diameter which is smaller than the external diameter of the projection. The projection may be in the form of an annular bulge. The journal may have a conical surface (12c), with the annular bulge running curved in the outward direction with an apex from which the conical surface extends axially outwards.

USE - For a cardan joint fitting.

ADVANTAGE - More uniform injection of lubricant.

DESCRIPTION OF DRAWING(S) - The drawing shows an enlarged cut-away view of one of the journals of the cross link.

Journal 12

Projection 12b

Conical surface 12c

Dust shield 30

Dwg. 2/3

FS GMPI

FA AB; GI

START LOCAL KERMIT RECEIVE PROCESS

BINARY DATA HAVE BEEN DOWNLOADED TO MULTIPLES FILES 'IMAGEnnn.TIF'